



## ストリゴラクトンの受容機構に関する研究

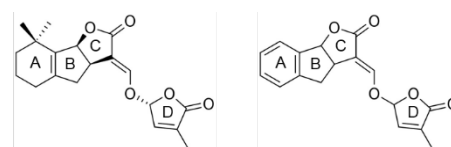
著者	安井 令
号	16
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第368号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00126113">http://hdl.handle.net/10097/00126113</a>

	やすい れい
氏 名（本籍地）	安井 令
学 位 の 種 類	博士（生命科学）
学 位 記 番 号	生博第 368 号
学位授与年月日	平成 3 1 年 3 月 2 7 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 ， 専 攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）分子生命科学専攻
論 文 題 目	ストリゴラクトンの受容機構に関する研究
博士論文審査委員	（主査）教授 田中 良和 教授 有本 博一 教授 経塚 淳子

## 論文内容の要旨

### 【背景・目的】

ストリゴラクトン (Strigolactones : SLs) は、根圏におけるアレロケミカルとして機能するとともに、植物の枝分かれなどを調節する植物ホルモンとして働く (図 1)。標準的な SL は、三環構造 (A,B,C 環) とメチルフラノン環 (D 環) がエノールエーテルを介して結合した特徴的な四環構造を有している。イネの SL の受容体である DWARF14 (D14) タンパク質は、ジベレリンの受容体である GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1) と同様に、 $\alpha/\beta$ -hydrolase ファミリーに属している。しかし、GID1 では加水分解酵素反応に重要な触媒三つ組残基の His が Val に置換している一方で、D14 では全ての触媒三つ組残基が保存されているとともに、実際に SL を ABC 環部と D 環部に加水分解することが報告されている。D14 による SL シグナル伝達において、D14 の SL 加水分解酵素活性がどのように関与しているかは未だ明らかになっていない。近年、D14 が SL を加水分解する際、D 環部に由来する中間体が D14 に共有結合した共有結合中間体 (Covalently Linked Intermediate Molecule : CLIM) が D14 の構造変化を誘導し、SL シグナルを伝達しているという説が提唱された。しかし、構造変化した D14 の活性ポケット中に X 線結晶構造解析により観察された CLIM は極めて不明瞭であることや、D14 と SL の加水分解酵素反応は非常に遅い一方で、SL 処理した植物体内では SL シグナル伝達のリプレッサータンパク質が迅速に分解されることなどから、D14 による SL シグナル伝達における CLIM の重要性には疑問が残る。そこで本研究では、D14 の SL シグナル伝達状態を誘導している化学シグナルを明らかにするとともに、D14 の SL 加水分解酵素活性の必要性や意義について追究した (第一章)。また、タンパク質の熱変性温度の変化を指標に受容体とリガンドの相互作用を評価する手法である Differential Scanning Fluorimetry (DSF) 法によって、生物活性を有する SL のみが D14 の熱変性温度を低下させることが明らかになっている。そこで、D14 の熱変性温度を低下させる化合物の中には SL アゴニストが存在すると考え、DSF 法を一次スクリーニングに利用したケミカルスクリーニングに取り組み、新規 SL アゴニストの創出を目指した (第二章)。



5-デオキシストリゴール (天然型) GR24 (合成アナログ)

図1：代表的なSLおよびSLアナログの化学構造

### 【結果・考察】

#### 第一章 SL の受容機構の解明

① DSF 法において観察される D14 の不安定化は、D14 の SL シグナル伝達状態と関係が深いと考えられるため、D14 による SL 加水分解酵素反応において D14 が不安定化するタイミングを追究した。シロイヌナズナの D14 オルソログである AtD14 と SL 合成アナログ GR24 の加水分解酵素反応を各時間行い、反応溶液を LC-MS/MS および DSF 法による相互作用解

析に供した。本試験の結果、基質である GR24 の減少に伴い、等しいモル数の ABC 環部と D 環部がほぼ同じ速度で生成され、D 環部の生成が遅延する傾向は認められなかった (図 2a)。また、AtD14 の熱変性温度の低下は GR24 の加水分解酵素反応の開始時が最大であり、GR24 の減少に伴って、その熱変性温度の低下は観察されなくなった (図 2b)。さらに、D14 によって加水分解されにくい SL アゴニストである CN-PMF を基質に使用した場合には、AtD14 の熱変性温度は長時間低下していた。したがって、D 環部由来の化合物が D14 と共有結合するとしても、その状態は長く続かないこと、そして、D14 を不安定化させている化学シグナルは SL そのものであることが示唆された。

次に、D 環部由来の化合物による D14 の化学修飾を経時的に分析した。AtD14 と GR24 または CN-PMF の加水分解酵素反応を行い、LC-MS/MS によって反応溶液中の AtD14 タンパク質を分析した。その結果、化学修飾された AtD14 が反応開始時から十数分または数時間にかけて増加していく様子が観察された。この様子は、上記の AtD14 の熱変性温度の低下の様子と一致しないため、AtD14 の化学修飾と At D14 の SL シグナル伝達状態には関連が

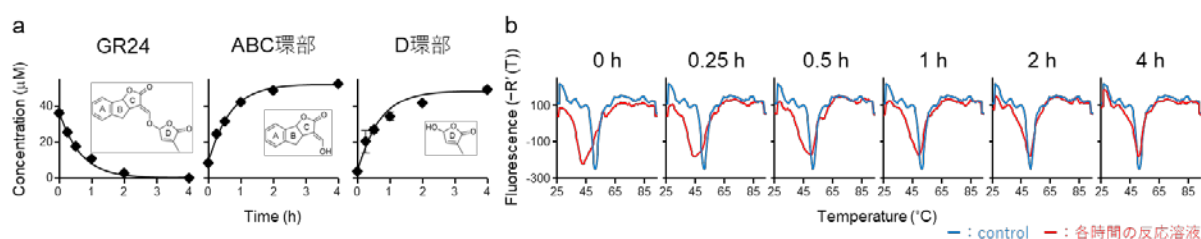


図2：AtD14とGR24の加水分解酵素反応および相互作用の経時的な同時解析。a：各時間のGR24およびGR24の加水分解酵素反応産物の濃度。平均値±SD (n = 3)。b：各時間の反応溶液におけるAtD14の融解温度曲線。controlはアセトンを添加したものを示す。

ないと考えられた。

② 本研究室の先行研究において、AtD14 の触媒三つ組残基の Asp を Ala に置換した D218A 変異体タンパク質は、SL 加水分解酵素活性が顕著に低下するにも関わらず、シロイヌナズナの *atd14* 変異体の表現型を相補することが明らかになっている。そこで、D218A 変異体の詳細な機能解析を行った。まず、酵母スリーハイブリッド法によって、D218A 変異体と SL シグナル伝達に参与する F-box タンパク質である MAX2 の相互作用を解析した。その結果、F-box タンパク質を安定化させる ASK1 タンパク質存在下において、D218A 変異体と MAX2 は SL 依存的に相互作用することが明らかになった。次に、*atd14* 変異体と SL 欠損変異体である *max4* 変異体の二重変異体に D218A 変異体を過剰発現させた組換え植物を作製し SL を外部投与した。その結果、この組換え植物の枝分かれ過剰な表現型が回復した。これらの結果は、D218A 変異体は SL 依存的にそのシグナルを伝達していることを示している。並行して、AtD14 の触媒三つ組残基の Ser を Cys に置換した S97C 変異体の機能解析に取り組んだ。S97C 変異体を組換えタンパク質として発現・精製した後、その SL 加水分解酵素活性を調べた。その結果、D218A 変異体と同様に、S97C 変異体の SL 加水分解酵素活性は顕著に低下していた。次に、DSF 法によって S97C 変異体と SL の相互作用を解析したところ、SL 添加時に S97C 変異体の熱変性温度はわずかに低下した。また、*atd14* 変異体に S97C 変

異体を過剰発現させたところ、*atd14* 変異体の表現型が部分的に相補した。したがって、D218A 変異体と同様に、S97C 変異体は SL 加水分解酵素活性が顕著に低下するにも関わらず、SL と相互作用して、そのシグナルを伝達していることが示唆された。D218A 変異体と S97C 変異体の機能解析の結果から、AtD14 による SL シグナルの伝達には AtD14 の SL 加水分解酵素活性は必須ではないことが支持された。また、D218A 変異体を過剰発現させた植物は、SL 高感受性を示したことから、D218A 変異体を過剰発現させた植物では、その SL 加水分解酵素活性の低下によって SL が蓄積していることが考えられた。この結果から、AtD14 の SL 加水分解酵素活性は SL の不活性化に寄与する可能性が示唆された。

## 第二章 新規 SL アゴニストの創出

DSF 法によって AtD14 と市販ケミカルライブラリーに含まれる 10,000 化合物の相互作用を解析したところ、111 化合物が AtD14 の熱変性温度を低下させた。次に、AtD14 の活性ポケットと相互作用する化合物を選抜するため、111 化合物の AtD14 による SL 加水分解酵素反応の阻害活性を調べた。さらに、DSF 法による相互作用解析において、各化合物が AtD14 の熱変性温度を濃度依存的に低下させるか否かを調べ、19 化合物を候補化合物として選抜した。これらの化合物をシロイヌナズナの胚軸伸長阻害試験に供したところ、1 化合物 (N-(3,4-dichlorophenyl)-4-trifluoromethyl-2-thiazolamine ; 113D10) が *AtD14* 依存的に胚軸伸長を阻害した (図 3)。同様に、113D10 は *AtD14* 依存的にシロイヌナズナの枝分かれを抑制した。興味深いことに、GR24 と比較するとその活性は低いものの、113D10 は SL と共通する部分構造を有しておらず、また、AtD14 によって極めて加水分解されにくいことも明らかになった。このことから、リガンドの加水分解を伴わなくとも AtD14 は SL シグナルを伝達できることが示唆された。続いて、113D10 の類縁化合物の化学合成とその生物活性の評価を行い、113D10 よりもわずかではあるが生物活性が向上した化合物 8 を獲得した (図 3)。113D10 および化合物 8 は、根寄生植物種子の発芽を誘導しなかったことから、これらの化合物は D14 に選択的な新規 SL アゴニストであると考えられる。

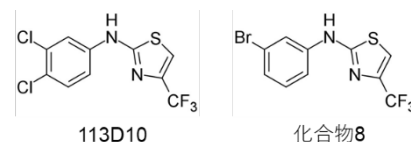


図3：113D10および化合物8の化学構造

### 【発表論文】

- 1) Y Seto\*, R Yasui\*, et al. Strigolactone perception and deactivation by a hydrolase receptor DWARF14. *Nature Communications* (\*equal contribution, in press).
- 2) R Yasui, et al. Chemical screening of novel strigolactone agonists that specifically interact with DWARF14 protein. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (改訂中).

## 論文審査結果の要旨

安井令氏は、東北大学大学院生命科学研究科博士課程において、ストリゴラクトンの受容機構に関する研究に従事した。種々の物理化学的解析や遺伝子組換え植物を用いた実験により、シグナル伝達を誘導する分子がストリゴラクトンそのものであることを同定したほか、結合により構造が不安定化するように大きく構造変化することや、シグナル伝達にはストリゴラクトンの加水分解反応自体が必要ではないことなど、様々な興味深い分子特性を明らかにした。これらの知見に基づき、ストリゴラクトンとストリゴラクトン受容体の結合に起因するシグナル伝達の分子機構の詳細を明らかにした。また、ケミカルスクリーニングにより、新規なストリゴラクトンアゴニストの獲得にも成功している。これらの研究成果は2報の国際誌にすでに受理されており (Seto et al., *Nature Communications*, in press, Yasui et al., *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, in press), 学術的に十分に意義のある内容であることが示されている。

これらの内容を収めた博士学位論文は期日までに主査、副査に提出された。査読の後に、博士論文審査会が開催され、論文の内容に関する試問が行われたが、試問の結果、博士の学位を与えるに十分な内容であることが、主査、副査から認定された。試問の際には、博士論文の内容について複数の修正箇所が指摘され、申請者により修正された学位論文が主査、副査に提出された。

これらの事実は、安井令氏が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、安井令提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。